



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11030617 A**(43) Date of publication of application: **02 . 02 . 99**

(51) Int. Cl.

G01N 33/92**C12Q 1/26****C12Q 1/28****C12Q 1/32****C12Q 1/44****C12Q 1/60**(21) Application number: **10146636**(22) Date of filing: **12 . 05 . 98**(30) Priority: **13 . 05 . 97 JP 09137713**(71) Applicant: **WAKO PURE CHEM IND LTD**(72) Inventor:
MIKI YUTAKA
IMASHIYOU NOBUKO
KOYAMA ISAO
HANADA TOSHIRO(54) **LDL-CHOLESTEROL MEASURING METHOD**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure cholesterol in low density lipoprotein(LDL) without complicated pretreatment operation by measuring under the presence of dimethyl(DM)- α -cyclodextrin(CD) and poly- β -CD.

SOLUTION: In the case of a dual reagent system measuring method, a sample is mixed with a first reagent containing DM- α -CD or/and poly- β -CD. Under the presence of this compound, cholesterol oxidase(COD) or

cholesterol dehydrogenate(CHD) contained in a second reagent is made to react. In the case of an oxidation coloration method, for instance, the first reagent containing DM- α -CD or/and poly- β -CD, and the second reagent containing COD are used, and a coupler, a developer, peroxidase(POD) and cholesterol esterase(CHE) are contained in the first reagent or the second reagent. In this method, cholesterol in LDL can be directly measured by a general-purpose automate analysis device.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-30617

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月2日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
G 0 1 N 33/92		G 0 1 N 33/92	B
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	
1/28		1/28	
1/32		1/32	
1/44		1/44	

審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-146636
(22) 出願日 平成10年(1998) 5月12日
(31) 優先権主張番号 特願平9-137713
(32) 優先日 平9(1997) 5月13日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000252300
和光純薬工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(72) 発明者 三木 豊
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内
(72) 発明者 今莊 展子
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内
(72) 発明者 小山 勲
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LDL-コレステロール測定法

(57) 【要約】

【課題】 低比重リポタンパク (LDL) 中のコレステロールを、従来法に於いて必要であった、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離するための煩雑な前処理操作なしに直接自動分析装置等を用いて測定し得る方法及びそれに用いられる試薬を提供。

【解決手段】 ジメチルー α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリンの存在下で測定を行うことを特徴とする、LDL中のコレステロール測定法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ジメチル- α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリンの存在下で測定を行うことを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定法。

【請求項2】 コレステロールオキシダーゼ又はコレステロールデヒドロゲナーゼを用いる低比重リポタンパク中のコレステロールの測定方法であって、試料を予めジメチル- α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリンを含んでなる試薬で処理した後、該化合物の存在下でコレステロールオキシダーゼ又はコレステロールデヒドロゲナーゼを反応させることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定法。

【請求項3】 ジメチル- α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリンのコレステロール測定時の反応液中の濃度が、0.0001~20% (W/V) である、請求項1又は2に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定法。

【請求項4】 ジメチル- α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリンを含有させてなることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項5】 ジメチル- α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリンを含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ、ペルオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項6】 コレステロールエステラーゼが第一試薬に含まれている、請求項5に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項7】 コレステロールエステラーゼが第二試薬に含まれている、請求項5に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項8】 コレステロールエステラーゼが第一試薬及び第二試薬に含まれている、請求項5に記載の低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項9】 ジメチル- α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリン、及びコレステロールエステラーゼを含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパ及びペルオキシダーゼの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項10】 カップラーとデベロッパの一方が第一試薬に含まれ、他方が第二試薬に含まれている、請求項5~9に記載の低比重リポタンパク中のコレステロ-

ール測定用試薬。

【請求項11】 ジメチル- α -シクロデキストリン又は／及びポリ- β -シクロデキストリン、コレステロールエステラーゼ、及びカップラー（又はデベロッパ）を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、及びデベロッパ（又はカップラー）を含んでなる第二試薬とを組み合わせることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用キット。

【0001】

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】 本発明は、血清、血漿などの生体試料中に存在する低比重リポタンパク（以下、LDLと略記する。）中のコレステロールの測定方法及びこれに用いる試薬に関する。

【0002】

【発明の背景】 血清中の脂質の主な成分はコレステロール、トリグリセライド、リン脂質等であり、これら血清脂質はアポタンパクと結合してリポタンパクを形成し血中を循環する。該リポタンパクは比重の差により高比重リポタンパク（HDL）、LDL、超低比重リポタンパク（VLDL）カイロミクロン（CM）等に分類される。これらリポタンパクのうち、HDLは組織に沈着した過剰なコレステロールを肝臓へ運搬する作用があり、抗動脈硬化作用を有し、一方、LDLは肝臓から各組織へのコレステロールの主たる運搬体であり、LDLの増加は動脈硬化発生と密接な関係があると考えられている。従って、LDL中のコレステロール（以下、LDL-コレステロールと略記する。）は、動脈硬化症、虚血性心疾患（冠動脈疾患）の危険因子と考えられ、該LDL-コレステロールの含有量は、これら疾患の診断・治療および予防の重要な指標となる。

【0003】 従来、LDL-コレステロールの測定法としては、沈澱法、超遠心法、電気泳動法、算出式による算出法等が知られている。これら従来法のうち、沈澱法、超遠心法及び電気泳動法は、沈澱・遠心分離処理、超遠心分離処理或いは電気泳動処理により、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離する前処理工程が必要であるため、操作が煩雑であり、現在、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置だけで直接測定を実施することができないという問題点を有している。また、フローデワルド（Friedewald）の式で知られている総コレステロール値、HDL-コレステロール値及びトリグリセライド値から算出する算出法も、トリグリセライドが500mg/dl以上含有する試料を用いた場合には、正確なLDL-コレステロール量を測定することができないという問題を有している。

【0004】 近年、従来法に於ける上記の如き問題点を解消するために、種々の方法が開発されており、例えば特開平7-280812号公報に開示された方法もその一つであ

る。即ち、LDLを凝集剤又は／及び抗体を使用して凝集させた後に、LDL以外のリポタンパクに含まれるコレステロールを定量反応に関与しない別の反応系に導いて消去（消費）させた後、界面活性剤又は／及び無機塩類を使用して、凝集させたLDLを定量反応ができる程度に溶解させ、LDL-コレステロールを定量反応に付し該溶液の吸光度を測定するという方法がそれである。

【0005】しかしながら、この方法は、測定時の試薬の形態が3試薬系又は4試薬系となるため、このような試薬形態での測定が可能なく一部の自動分析装置にしか適用できず、通常の臨床検査に於いて用いられている2試薬系での測定にしか使用できない自動分析装置を用いては測定を実施することができないという問題点がある。また、この方法では、測定に用いる試薬の数が多くなるため、測定値の再現性が低下するという問題点もあった。

【0006】更に、煩雑な前処理操作なしでLDL-コレステロールを測定する方法として特開昭58-165800号公報に開示されている方法がある。しかしながら、この方法は、試薬中の例えば界面活性剤やコレステロールエステラーゼ（以下、CHEと略記する。）の使用濃度が限定されるため試薬の調製が煩雑であり、更に測定時のpHや、測定時間間隔等測定条件を厳密に設定しなくてはならず、しかもHDL中のコレステロールもある程度反応することから、動力学的測定、すなわち、レイト・アッセイでしかLDL-コレステロールの測定を行うことができないため、実用的な測定方法とは言い難い方法であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記した如き状況に鑑み、本発明が解決しようとする課題は、生体試料中のLDL-コレステロールを、従来法に於いて必要であった、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離するための煩雑な前処理操作なしに直接自動分析装置等を用いて測定することを可能とする方法及びそれに用いられる試薬の提供にある。

【0008】

【発明を解決するための手段】本発明は、ジメチル- α -シクロデキストリン（以下、DM- α -CDと略記する。）又は／及びポリ- β -シクロデキストリン（以下、ポリ- β -CDと略記する。）の存在下で測定を行うことを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定法の発明である。

【0009】また、本発明は、コレステロールオキシダーゼ（以下、CODと略記する。）又はコレステロールデヒドロゲナーゼ（以下、CHDと略記する。）を用いるLDL-コレステロール測定法であって、試料を予めDM- α -CD又は／及びポリ- β -CDを含んでなる試薬で処理した後、該化合物の存在下でCOD又はCHDを反応させることを特徴とする、LDL-コレステロ

ール測定法の発明である。

【0010】更に、本発明は、DM- α -CD又は／及びポリ- β -CDを含有させてなることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬の発明である。

【0011】また、本発明は、DM- α -CD又は／及びポリ- β -CDを含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパー、ペルオキシダーゼ（以下、PODと略記する。）及びCHEの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬の発明である。

【0012】更にまた、本発明は、DM- α -CD又は／及びポリ- β -CD、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパー及びPODの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬の発明である。

【0013】また、本発明は、DM- α -CD又は／及びポリ- β -CD、CHE、及びカップラー（又はデベロッパー）を含んでなる第一試薬と、COD、CHE、POD、及びデベロッパー（カップラー）を含んでなる第二試薬とを組み合わせることを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用キットの発明である。

【0014】即ち、本発明者等は、LDL-コレステロールを、LDL以外の不要なリポタンパクを分離分別するための前処理操作なしに直接自動分析装置で測定し得る方法を見出すべく鋭意研究を重ねた結果、生体試料中のLDL-コレステロールの測定を、DM- α -CD又は／及びポリ- β -CDの存在下で行えば、LDL以外の不要なリポタンパクを分離分別することなくLDL中のコレステロールを特異的に測定することが可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0015】本発明に於いて用いられるDM- α -CD及びポリ- β -CDの使用濃度は、LDL以外のリポタンパクに含まれているコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを抑制し得る濃度であればよく、特に限定されないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度、即ち最終の反応液中の濃度が通常0.0001~10%（W/V）、好ましくは0.001~1%（W/V）である。

尚、これらCD誘導体は、市販のものを用いても良いし、公知の方法に準じて合成したものを用いても良い。また、例えば、本発明の方法を2試薬系測定法により実施する場合の第一試薬中のDM- α -CD及びポリ- β -CDの使用濃度は、試料、第一試薬及び第二試薬の液量比等により異なるため一概には言えないが、通常0.001~10%（W/V）、好ましくは0.001~1%（W/V）である。尚、これらCD誘導体は単独で用いても、或はこ

れらを組み合わせて用いてもよいことは言うまでもないが、2種類を共存させて使用する場合の夫々のCD誘導体の使用濃度は、LDL以外のリポタンパクに含まれているコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを抑制し得る濃度であればよく、コレステロール測定時の反応液中の濃度、即ち最終の反応液中の濃度が夫々通常0.0001~10% (W/V)、好ましくは0.001~1% (W/V)である。また、これらを共存させて使用する場合の使用割合についても、LDL以外のリポタンパクに含まれているコレステロールがコレステロール測定反応

に関与するのを抑制し得る割合であればよく、特に限定されないが、通常1:1~1:100000、好ましくは1:1~1:1000である。

【0016】本発明の測定法は、上記した如きDM- α -CD又は/及びポリ- β -CDを存在させる以外は、自体公知のコレステロール測定法に準じて、実施すれば良く、使用される試薬類もこれら自体公知の方法に準じて適宜選択すればよい。即ち、血清、血漿等の生体試料中のLDL-コレステロールを、DM- α -CD又は/及びポリ- β -CDの存在下、自体公知のコレステロール測定法に準じて測定することにより、生体試料中のLDL-コレステロールを特異的に測定することができる。

【0017】これら自体公知のコレステロール測定法としては、生体試料中のコレステロールを測定し得る自体公知のコレステロール測定法は全て挙げられるが、酵素反応を利用する、例えば試料中のコレステロールエステルをCHEによって遊離コレステロールと脂肪酸に分解し、初めから存在する遊離コレステロールと共に、CODによって酸化して、コレステ-4-エン-3-オンと過酸化水素にし、PODの存在下、生成した過酸化水素で被酸化性呈色試薬を酸化発色させて、生じた酸化色素を比色定量する酸化呈色法、例えば試料中のコレステロールエステルをCHEによって遊離コレステロールと脂肪酸に分解し、初めから存在する遊離コレステロールと共にCHDの存在下NAD(P)と反応させて、生成するNAD(P)Hを340nmで測定する紫外部測定法等が好ましく挙げられる。

【0018】本発明の測定法に用いられるCODは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、ノカルディア属、シュードモナス属等の微生物に由来するもの、牛脾臓等動物臓器に由来するもの等は全て使用可能である。CODの使用量は、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02~10u/ml、好ましくは0.1~2u/mlである。

【0019】本発明の測定法に用いられるCHEは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、キャンディダ属、シュードモナス属等の微生物に由来するもの、牛脾臓等動物臓器に由来するもの等は全て使用可能である。CHEの使用量は、コレ

ステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02~10u/ml、好ましくは0.1~2u/mlである。

【0020】本発明の測定法に用いられるPODは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、西洋ワサビ、大根等の植物に由来するもの、カビ、酵母等の微生物に由来するもの、動物の白血球、甲状腺等に由来するもの等は全て使用可能である。PODの使用量は、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~50u/ml、好ましくは0.1~5u/mlの範囲である。

【0021】本発明の測定法に用いられる被酸化性呈色試薬としては、PODの存在下、過酸化水素と反応して呈色するものであれば何れにても良いが、4-アミノアンチピリン(4-AA)等のカップラー及び、該カップラーと酸化縮合して色素を生ずるデベロッパーとの組合せ、即ち、例えば4-AAとフェノール系化合物、ナフトール系化合物若しくはアニリン系化合物との組合せ、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとアニリン系化合物との組合せ等や、例えば2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)、トリフェニルメタン系ロイコ色素、ジフェニルアミン誘導体、ベンジジン誘導体、トリアリルイミダゾール誘導体、ロイコメチレンブルー誘導体、o-フェニレンジアミン誘導体等の酸化によってそれ自体が発色する発色剤等が挙げられる。デベロッパーとしてのフェノール系化合物の具体例としては、例えばフェノール、p-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール等が挙げられ、ナフトール系化合物の具体例としては、例えば1-ナフトール、1-ナフトール-2-スルホン酸、1-ナフトール-2-カルボン酸等が挙げられ、また、アニリン系化合物の具体例としては、例えばN,N-ジエチルアニリン、N-エチル-N-(β -ヒドロキシエチル)-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン(FDAOS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニル-エチレンジアミン(EMSE)等が挙げられる。カップラーとデベロッパーとの組合せを用いる場合、カップラーの使用量は、用いるカップラーの種類や組み合わせるデベロッパーの種類等により異なるため一概には言えないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~100mM、好ましくは0.1~10mMであり、カップラーとして4-AAを使用する場合の使用量は、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~50mM、好ましくは0.1~5mMである。また、

デベロッパーの使用量は、用いるデベロッパーの種類や組み合わせるカップラーの種類等により異なるため一概には言えないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01~50mM、好ましくは0.1~5mMである。トリフェニルメタン系ロイコ色素の具体例としては、例えばロイコマラカイトグリーン、ビス(p-ジェチルアミノフェニル)-2-スルホフェニルメタン、ビス(p-ジェチルアミノフェニル)-3,4-ジスルホプロポキシフェニルメタン・ジナトリウム塩等が挙げられ、ジフェニルアミン誘導体の具体例としては、例えばビス[4-ジ(2-ブトキシエチル)アミノ-2-メチルフェニル]アミン、N,N-ビス(4-ジェチルアミノ-2-メチルフェニル)-N'-p-トルエンスルホン尿素等が挙げられ、また、ロイコメチレンブルー誘導体の具体例としては、例えば10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン・ナトリウム塩、10-[3-(メトキシカルボニルアミノメチル)フェニルメチルアミノカルボニル]-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン等が挙げられる。更に、ベンジジン誘導体の具体例としては、例えばベンジジン、o-トリジン、o-ジアニシジン、3,3'-ジアミノベンジジン、3,3',5,5'-テトラアミノベンジジン等が挙げられ、トリアリルイミダゾール誘導体の具体例としては、例えば2-(4-カルボキシフェニル)-3-N-メチルカルバモイル-4,5-ビス(4-ジェチルアミノフェニル)イミダゾール、2-(3-メトキシ-4-ジェチルアミノフェニル)-3-N-メチルカルバモイル-4,5-ビス(2-メチル-4-ジェチルアミノフェニル)イミダゾール等が挙げられる。これら発色剤の使用量は、通常この分野で用いられる濃度である。

【0022】本発明の測定法に用いられるCHDは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、ノカルディア属に由来するもの等が使用可能である。CHDの使用量は、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.1~100u/ml、好ましくは1~50u/mlである。

【0023】本発明の測定法に用いられるNAD(P)は、特に限定されず、通常この分野で使用されているものは全て使用可能である。NAD(P)の使用量は、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02~50mM、好ましくは0.1~10mMである。

【0024】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬は、例えば血清や血漿等の生体由来試料中のLDL-コレステロールを測定するために使用されるもので、DM- α -CD又は/及びポリ- β -CDを使用する以外は、上記した如き自体公知のコレステロール測定法に使用される試薬類、例えば酸化呈色法に於いて使用されるCOD、CHE、POD、被酸化性呈色試薬等の試薬類、例えば紫外部測定法に於いて使用されるCHE、C

HD、NAD(P)等の試薬類を、この分野で使用される濃度範囲で含有するように調製されたものであり、構成要件の好ましい態様や使用濃度等は、上で述べた通りである。

【0025】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬は、1試薬系測定法用として調製されたものでも2試薬系測定法用として調製されたものでも又それ以上に分けたものでも何れにてもよく、特に限定されない。尚、2試薬以上の試薬に分けた場合には、特異性、測定精度等の点を考慮すると、以下のような組成としておくことが望ましい。即ち、先ず、酸化呈色法用の試薬の場合、第一試薬にDM- α -CD又は/及びポリ- β -CDを、第二試薬にCODを含有させておくことが望ましく、これ以外のCHE、POD等の酵素類、カップラー及びデベロッパー等は少なくとも何れかの試薬に含まれていればよい。また、紫外部測定法用の試薬の場合、第一試薬にDM- α -CD又は/及びポリ- β -CDを、第二試薬にCHDを含有させておくことが望ましく、これ以外のNAD(P)等は少なくとも何れかの試薬に含まれていればよい。

【0026】本発明の方法を、2試薬系測定法により実施する場合には、試料とCOD又はCHDを反応させる前に、試料とDM- α -CD又は/及びポリ- β -CDを含んでなる第一試薬とを混合する等して試料を第一試薬で処理した後、該化合物の存在下で、第二試薬に含有させたCOD又はCHDを反応させる方が、特異性、測定精度等の点から望ましい。

【0027】例えば酸化呈色法の場合、上記した如き試薬の組合せとしては、例えば以下の如きものが挙げられる。

(i) DM- α -CD又は/及びポリ- β -CDを含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパー、POD及びCHEの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。

(ii) DM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CODを含んでなる第二試薬とからなるものであって、カップラー、デベロッパー及びPODの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。また、例えば紫外部測定法の場合、上記した如き試薬の組合せとしては、例えば以下の如きものが挙げられる。

(i') DM- α -CD又は/及びポリ- β -CDを含んでなる第一試薬と、CHDを含んでなる第二試薬とからなるものであって、NAD(P)及びCHEの夫々が少なくとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。

(ii') DM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CHDを含んでなる第二試薬とからなるものであって、NAD(P)が少な

くとも第一試薬と第二試薬の何れかに含まれている試薬からなるもの。尚、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬を2液法用として調製する場合には、CHEを、DM- α -CD又は γ -及びポリ- β -CDと共に第一試薬に含有させて用いる方が、LDL-コレステロールへの特異性及びLDL-コレステロールの測定精度を向上させる上で、望ましい。また、上記した如き本発明の酸化呈色法用試薬の組合せに於いては、試薬の安定性（試薬盲検の安定性）を考慮すると、カップラーとデベロッパの一方を第一試薬に含有させ、他方を第二試薬に含有させることが望ましい。

【0028】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、緩衝剤が含まれていても良い。本発明に於いて使用される緩衝剤としては、用いられる各種酵素類及び被酸化性呈色試薬等の組合せ等により異なるが、この分野に於いて通常用いられるものであればよく、pH5~11の範囲で緩衝作用を有するものが使用される。また、これら緩衝剤の使用濃度は、通常1mM~5M、好ましくは5mM~1Mである。これら緩衝剤のうち、特にLDL-コレステロールへの特異性の点から、例えばN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸(CHES)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)等のアミノエタンスルホン酸誘導体、例えばN-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPS)、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPSO)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(EPPS)、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(HEPPSO)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPSO)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)(POPSO)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)、2-ヒドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPSO)等のアミノプロパンスルホン酸誘導体、例えばN-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチ

ル]グリシン(Tricine)等のグリシン誘導体等のカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類を緩衝剤として用いることが好ましい。

【0029】また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、イオン性化合物、例えばデキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、リンタングステン酸等のポリアニオン等が含まれていても良い。これらは単独または混合して使用することができる。更に、イオン性化合物と、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺等の2価のカチオン（或いはこれら2価のカチオンを生じさせ得る金属塩）とを組み合わせ使用してもよい。これらの使用濃度は特に限定されないが、イオン性化合物等の使用濃度は、反応液中の濃度が、通常0.01~10% (w/v) であり、また、2価カチオンの使用濃度は、反応液中の濃度が、通常0.1~200mMである。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中にはLDL以外のリポタンパク中のコレステロールがコレステロール測定反応に関与することを防止するために、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の1種または2種以上を共存させてもよい。このような目的で使用可能な抗体としては、例えば抗アポリタンパクA抗体、抗アポリタンパクC抗体、抗アポリタンパクE抗体、抗 α リポタンパク抗体等が挙げられる。これら抗体の使用濃度は、LDL以外のリポタンパク中に含まれるコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを防止し得る濃度以上であればよく、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常0.001~10mgAb/ml、好ましくは0.01~1mgAb/mlとなるように反応液中に添加される。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、この分野に於いて通常用いられる界面活性剤、例えばアルキルベタイン誘導体（例えばラウリルベタイン、ステアリルベタイン、ラウリルジメチルアンモニウムベタイン、ココナツトベタイン、ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン、ラウリン酸アミドプロピルベタイン等）、イミダゾリニウムベタイン誘導体（例えばラウリルカルボキシメチルヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-アルキル-N-カルボキシエチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-ウンデシル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等）等のベタイン誘導体、例えばアルキルグリシン、アルキルジ(アミノエチル)グリシン、ジオクチルポリアミノエチルグリシン、N-アルキルポリアミノエチルグリシン、 β -アラニン誘導体等のアミノカルボン酸誘導体、例えばビス(2-ウンデシル、N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウム)クロル酢酸錯体、アルキルイミダゾリニウム誘導体等のイミダゾリニウム誘導体、例えばラウリルジメチルアミンオキサライド等のアミンオキサライド誘導体等の両性界面活性剤、例えばポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエ

ーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリエチレングリコールモノラウレート、ポリオキシエチレンラウリルエーテル等の非イオン性界面活性剤、例えば塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウム等の陽イオン性界面活性剤、例えばコール酸、デオキシコール酸、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤等の界面活性剤が含まれていても良い。これらは単独又は二種以上組み合わせる用いることができ、その使用濃度は、特に限定されないが、反応液中の濃度が、通常0.0001~10% (w/v)、好ましくは0.001~1% (w/v) である。

尚、LDL-コレステロールに対する特異性やLDL-コレステロールの測定精度等の点から、これら界面活性剤のうち、両性界面活性剤を本発明に係るCD誘導体と共存させて用いることが望ましい。

【0030】本発明のLDL-コレステロールの測定法を、2試薬系測定法により実施するには、例えば以下の如く行えばよい。即ち、酸化呈色法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えばDM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、CHE及びカップラー（又はデベロッパ）、要すれば両性界面活性剤、緩衝剤、抗体、イオン性化合物、2価のカチオン等を含有する第一試薬とを混合して生体試料を処理し、2~40℃で1~30分間反応させた後に吸光度(OD₁)を測定する。次いで、該反応液と、例えばCOD、POD及びデベロッパ

(又はカップラー)、要すれば緩衝剤等を含有する第二試薬とを混合し、2~40℃で1~60分反応させた後に吸光度(OD₂)を測定する。上記のOD₂からOD₁に由来する値(例えばOD₁に補正係数を掛けて求めた値)を差し引いた吸光度(OD₃)を求め、得られたOD₃を、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様にして求めた、LDL-コレステロール濃度とOD₃との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。また、紫外部測定法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えばDM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、及びCHE、要すれば両性界面活性剤、緩衝剤、抗体、イオン性化合物、2価のカチオン等を含有する第一試薬とを混合して生体試料を処理し、2~40℃で1~30分間反応させた後に340nmに於ける吸光度(OD_{1'})を測定する。次いで、該反応液と、例えばCHD、及びNAD(P)、要すれば緩衝剤等を含有する第二試薬とを混合し、2~40℃で1~60分反応させた後に340nmに於ける吸光度(OD_{2'})を測定する。上記のOD_{2'}からOD_{1'}に由来する値(例えばOD_{1'}に補正係数を掛けて求めた値)を差し引いた吸光度(OD_{3'})を求め、得られたOD_{3'}を、例えば予め

LDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様にして求めた、LDL-コレステロール濃度とOD₃との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。

【0031】また、本発明のLDL-コレステロールの測定法は、1試薬系測定法により実施しても良く、この場合は、例えば以下の如く行えばよい。即ち、酸化呈色法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えばCHE、COD、POD、被酸化性呈色試薬、DM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、要すれば両性界面活性剤、緩衝剤、抗体、イオン性化合物、カチオン等を含有する試液とを混合し、2~40℃で1~30分間反応させた後に吸光度(OD_s)を測定する。また、生体試料の代わりに生理食塩水等を使用し、上記と同じ試薬を用い上記と同様の操作を行って盲検値(OD_{bl})を求める。次いで、OD_sからOD_{bl}を差し引いた吸光度(OD_r)を求め、これを、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様にして求めた、LDL-コレステロール濃度とOD_sとの関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。また、紫外部測定法の場合、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えばCHE、CHD、NAD(P)、及びDM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、要すれば両性界面活性剤、緩衝剤、抗体、イオン性化合物、カチオン等を含有する試液とを混合し、2~40℃で1~30分間反応させた後に340nmに於ける吸光度(OD_{s'})を測定する。また、生体試料の代わりに生理食塩水等を使用し、上記と同じ試薬を用い上記と同様の操作を行って盲検値(OD_{bl'})を求める。次いで、OD_{s'}からOD_{bl'}を差し引いた吸光度(OD_{r'})を求め、これを、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等を試料として上記と同様にして求めた、LDL-コレステロール濃度とOD_{s'}との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。

【0032】本発明のLDL-コレステロール測定用キットは、例えば血清や血漿等の生体由来試料中のLDL-コレステロールを測定するために使用されるもので、このようなキットとしては以下の如きものが望ましい。即ち、酸化呈色法用の場合、DM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、CHE、及びカップラー（又はデベロッパ）を含んでなる第一試薬と、COD、POD、及びデベロッパ（カップラー）を含んでなる第二試薬とを含んでなるものが挙げられる。また、紫外部測定法用の場合、DM- α -CD又は/及びポリ- β -CD、及びCHEを含んでなる第一試薬と、CHD、及びNAD(P)を含んでなる第二試薬とを含んでなるものが挙げられる。尚、夫々の構成要素の好ましい態様、具体例については上で述べた通りである。また、当該キットに

は、必要に応じて、LDL-Cコレステロール標準品等が組み合わされていても良いことは言うまでもない。

【0033】本発明のLDL-Cコレステロールの測定法は、DM- α -CD又は/及びポリ- β -CDの存在下で、コレステロールの測定を行わせるために、HDLのみならずVLDL、カイロミクロン等のLDL以外のリポタンパク中のコレステロールとも実質的に反応せず、LDL-Cコレステロールのみと特異的に反応するので、従来法では困難であったエンドポイント・アッセイでのLDL-Cコレステロール測定を可能ならしめるものである。また、標準品についてもLDL-Cコレステロールの純品を用いる必要はなく、コレステロールを含む、標準液あるいは粘度、比重等が正常血清と同様の物性を持つ標準血清を使用することができる。

【0034】以下に、実施例及び参考例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0035】

【実施例】

実施例1

日立7170形自動分析装置〔(株)日立製作所製〕を使用して、本発明の測定法により、超遠心法で分画した各種リポタンパク中のコレステロールを測定し、その反応性を検討した。

〔試料〕自体公知の超遠心法で血清より分画して得たLDL画分、HDL画分、VLDL画分及びCM画分を試料とした。尚、各試料中のコレステロールを、予め、市販の総コレステロール測定用試薬キット LタイプワコーCHO・H (和光純薬工業(株)製)を用いて、同キッ

試料について得られたコレステロール値

$$\text{反応率 (\%)} = \frac{\text{市販キットを用いて測定したコレステロール値}}{\text{試料について得られたコレステロール値}} \times 100$$

その結果を表1に示す。

【0036】

* トの現品説明書の標準操作法に従い測定した。

【試薬】

R-1 ; N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン Na 塩 (HDAOS : (株)同仁化学研究所製。) 0.6mM、Na₂SO₄ 0.4M及び所定のCD誘導体を所定濃度含有する100mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPES) -NaOH緩衝液 (pH7.0) をR-1とした。

R-2 ; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、CHE (旭化成工業(株)製) 4U/ml、POD (東洋紡(株)製。) 6U/ml及び4-AA 3mMを含有する100mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.0) をR-2とした。

〔CD誘導体〕以下のCD誘導体を使用した。

- ・DM- α -CD (和光純薬工業(株)製)
- ・ポリ- β -CD (和光純薬工業(株)製)

〔測定条件〕測定パラメータを以下のように設定して、各試料中のコレステロールを測定した。

測定方法 ; 2ポイント エンド[16]-[34]

20 試料量 ; 3 μ l

R-1 ; 270 μ l

R-2 ; 90 μ l

測定波長 ; 700/600nm

測定温度 ; 37℃

標準品濃度 ; 100mg/dl

〔結果〕各種試料について得られたコレステロール値と、市販のキットを用いて測定した各種試料中のコレステロール値とを、下記式に当てはめて、各リポタンパクの反応率を求めた。

※【表1】

※【0037】

表1

シクロデキストリン誘導体 (R-1中濃度)	各リポタンパクの反応率 (%)			
	LDL	HDL	VLDL	CM
シクロデキストリン無添加	100	58	100	100
DM- α -CD (0.06%)	102	33	3	2
DM- α -CD (0.1%) ポリ- β -CD (0.01%)	104	9	0	0

【0038】表1の結果から明らかな如く、本発明に係るCD誘導体の存在下でコレステロールの測定を行うと、LDL以外のリポタンパクとの反応が著しく抑制さ

れていることが判る。特にDM- α -CDとポリ- β -CDを併用した場合には、LDL以外のリポタンパクとは殆ど反応していないことが判る。これに対して、CD

非存在下で測定を行った場合には、VLDL及びCMとの反応が全く抑制されておらず、LDL-コレステロールを特異的に測定することは不可能であることが判る。以上のことから、DM- α -CD又は β -及びポリ- β -CDからなるCD誘導体の存在下でリポタンパク中のコレステロールの測定を行うと、LDL中のコレステロールを特異的に測定し得ることが判る。

【0039】実施例2

日立7170形自動分析装置〔(株)日立製作所製〕を使用して、本発明の測定法により、超遠心法で分画した各種リポタンパク中のコレステロールを測定し、その反応性を検討した。

〔試料〕実施例1と同じ。

〔試薬〕

R-1; 4-AA 1.2mM、CHE (旭化成工業(株)) *

表2

シクロデキストリン誘導体 (R-1中濃度)	各リポタンパクの反応率 (%)			
	LDL	HDL	VLDL	CM
シクロデキストリン無添加	75	97	75	38
ポリ- β -CD (0.13%)	99	10	32	16

【0042】表2の結果から明らかな如く、ポリ- β -CDとCHEとを第一試薬に共存させてコレステロールの測定を行うと、LDLとの反応には全く影響せず、LDL以外のリポタンパクとの反応が著しく抑制されており、LDL中のコレステロールを特異的に測定し得ることが判る。これに対して、CHEのみを第一試薬に添加した場合には、LDL以外のリポタンパク、特にHDL及びVLDLとの反応を殆ど抑制することができないだけでなく、LDLとの反応をも若干抑制してしまい、LDL中のコレステロールを特異的に測定することは不可能であることが判る。

【0043】実施例3

日立7170形自動分析装置〔(株)日立製作所製〕を使用して、本発明の測定法により、血清中のLDL-コレステロールを測定した。

〔試料〕新鮮ヒト血清8検体を試料とした。

〔試薬〕

(試薬1)

R-1; 4-AA 1.2mM及びポリ- β -CD 0.13%を含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-1とした。

R-2; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、CHE 4U/ml、POD (東洋紡(株)製。) 6U/ml、HDAOS 1.2mM及びリボミンLA 0.4%を含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-2とし

* 製) 1U/ml及び所定のCD誘導体を所定濃度含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-1とした。

R-2; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、POD (東洋紡(株)製。) 6U/ml及びHDAOS 1.2mMを含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-2とした。

〔CD誘導体〕ポリ- β -CD (和光純薬工業(株)製)〔測定条件〕実施例1と同じ。

〔結果〕実施例1と同様にして各リポタンパクの反応率を求めた。その結果を表2に示す。

【0040】

【表2】

【0041】

た。

(試薬2)

R-1; 4-AA 1.2mM、CHE (旭化成工業(株)製) 1U/ml、ポリ- β -CD 0.13%及びリボミンLA (アミノカルボン酸誘導体: ライオン(株)製、商品名) 含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-1とした。

R-2; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、POD (東洋紡(株)製。) 6U/ml及びHDAOS 1.2mMを含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-2とした。

(試薬3)

R-1; 4-AA 1.2mM、ポリ- β -CD 0.13%、CHE 1U/ml及びリボミンLA 0.1%を含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-1とした。

R-2; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、CHE 4U/ml、POD (東洋紡(株)製。) 6U/ml及びHDAOS 1.2mMを含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-2とした。

(試薬4)

R-1; 4-AA 1.2mM、CHE 1U/ml及びリボミンLA 0.1%を含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-1とした。

R-2; COD (天野製薬(株)製。) 4U/ml、PO

D (東洋紡(株)製。) 6U/ml及びHDAOS 1.2mMを含有する25mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH7.2) をR-2とした。

〔測定条件〕 実施例1と同じ。

〔結果〕 測定結果を表3に示す。

【0044】 参考例1

実施例3で用いた血清検体について、従来法のFriedewald

*dewald式によりHDL-コレステロール値を算出した。尚、測定操作は、自体公知の操作法に従って行った。

〔結果〕 測定結果を表3に併せて示す。

【0045】

【表3】

【0046】

表3

試料 No.	実 施 例 3				参考例1 (mg/dl)
	試薬1 (mg/dl)	試薬2 (mg/dl)	試薬3 (mg/dl)	試薬4 (mg/dl)	
1	155	136	135	186	130
2	118	86	87	141	81
3	104	87	89	133	75
4	132	104	106	157	101
5	101	77	79	129	70
6	155	136	137	192	130
7	184	167	167	219	161
8	159	139	140	198	138
平均値	138.5	116.5	117.4	169.4	110.8
参考例1との 相関係数	0.994	0.996	0.996	0.998	———
回帰式の 傾き	1.13	1.04	1.05	0.995	———
回帰式の y切片	-46.4	-9.90	-13.41	-57.73	———

【0047】 表3の結果から明らかな如く、ポリ-β-CD非共存下でのLDL中のコレステロール測定値、即ち、試薬4を用いて得られたコレステロール値に比べて、本発明のポリ-β-CDを含有する試薬、即ち、試薬1～3を用いて得られたLDL中のコレステロール測定値の方が、従来法、即ち、参考例1のFriedewald式で算出したLDL-コレステロール値により近いこと、即ち、より特異的にLDL中のコレステロールを測定し得ることが判る。更に、ポリ-β-CDと両性界面活性剤及びCHEとを共存させた場合(試薬2及び3)には、ポリ-β-CDのみに比べてFriedewald式で算出したLDL-コレステロール値により近づくこと、即ち、LDL-コレステロールへの特異性がより向上することが判る。

【0048】 実施例4

※血清、血漿等生体試料中のLDL-コレステロールの測定を実施するために使用される、測定用キットの代表的な例としては、以下のようなものが挙げられる。

(1) 第一試薬 (pH6～8) : DM-α-CD又は/及びポリ-β-CD、CHE、カップラー (又はデベロッパー)。

(2) 第二試薬 (pH6～8) : COD、CHE、POD、デベロッパー (カップラー)。

【0049】

【発明の効果】 以上述べた如く、本発明は生体試料中のLDL-コレステロールを特異的に且つ精度良く測定し得る方法並びにそれに用いられる試薬を提供するものであり、本発明を利用することにより、従来の方法では不可能であったLDL-コレステロールを直接、しかも汎用の自動分析装置を用いて測定し得る。

※

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/60

C 1 2 Q 1/60

(72) 発明者 花田 寿郎

兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内